

냉동·해빙한 생쥐배아의 발생에 미치는 해빙속도와 퇴화할구의 영향

한양대학교 자연과학대학 생물학과·*제일병원 산부인과 체외수정연구실

김문규·이호준·이승재*·전종영*

—Abstract—

Effects of Warming Rate and Degenerated Blastomere(s) on Development of Frozen and Thawed Mouse Embryos

Moon Kyoo Kim, Ho Joon Lee, Seung Jae Lee* and Jong Young Jun*

Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133, Korea

**IVF Laboratory, Department of Obstetrics and Gynecology, Cheil General Hospital, Seoul 110, Korea*

The present experiments have been done to verify the effects of the warming rate and the degenerated blastomere(s) on further development of the frozen and thawed 4- and 8-cell mouse embryos.

The embryos obtained from the mouse superovulated and mated were frozen in the solution of 15M DMSO in PBS containing 10% FCS at a slowly cooling rate(0.3°C/min). Two methods of warming slowly(8°C/min) and quickly (450°C/min) were applied for thawing embryos. The thawed embryos were grouped according to the number of healthy blastomere(s) in the embryos. Some of the embryos were eliminated their degenerated blastomere(s) by means of a micromanipulation technique. The embryos were examined their developmental phases after 48 or 72 hrs incubation.

The rates of blastocyst development from the frozen and thawed 4- and 8-cell embryos were 72.7% and 73.5%, respectively in case of thawing slowly, and were 78.9% and 80.0%, respectively in case of thawing quickly. The rate in case of thawing quickly was significantly higher than that in case of thawing slowly.

The rates of blastocyst development from the frozen and thawed 4- and 8-cell embryos eliminated their degenerated blastomere(s) increased 5.9% and 24.4%, respectively compared with those of control groups not eliminated. The more number of degenerated blastomere(s) were eliminated from the embryos, the higher rate of blastocyst development was shown.

It may be concluded from the results that the quickly thawing method is better for increasing survival rate than the slowly thawing one, and that the degenerated blastomere(s) in the frozen and thawed embryos affects as an interfering factor for further development of the embryos.

서 론

체외수정에 의한 배아의 이식이 사람을 포함하여 포유류에서 의학 및 축산등에 이용됨에 따라 배아를 효율적으로 이용할 수 있는 냉동·해빙 기술이 활발히 연구 개발되고 있다. Whittingham 등(1972)

* 본 실험은 日本 上智大學 生命科學研究所의 補助로 행하여 졌다.

이 냉동·해빙한 생쥐배아를 다른 모체에 이식하여 처음으로 새끼를 얻는 데 성공한 후, 쥐(Whittingham, 1975), 토끼(Mauer et al., 1976), 양(Willadsen et al., 1976) 등에서 성공하였으며, 최근에는 사람에서도 성공하였음이(Trounson and Mohr, 1983) 보고되었다.

냉동·해빙한 배아들의 발생률에 영향을 주는 요인들로서는, 동물의 종과 배아의 시기, 냉각속도(cooling rate)(Leibo et al., 1974; Rall et al., 1984),

해빙속도(warming rate)(Wilmut, 1972; Whittingham, 1978), 결빙억제제와 냉동액의 종류(Wilmut, 1972), 그리고 처리방법(Wilmut, 1972; Miyamoto et al., 1983) 등이 있다.

냉각속도는 보통 0.2~5°C/min 범위로서, 급속냉각(>1°C/min)(Whittingham, 1978; Palge et al., 1978)과 완만냉각(<0.5°C/min)(Whittingham et al., 1972; Wilmut, 1972)을 혼용하고 있으며, 해빙속도는 보통 5~500°C/min 범위로서 급속해빙(>100°C/min)(Whittingham et al., 1976; Wood et al., 1980; Miyamoto et al., 1983)이나 완만해빙(<10°C/min)(Whittingham, 1972; Leibo et al., 1974)중 선택하여 사용하고 있다.

냉동과 해빙과정을 거친 배아들은 대부분 정상이지만 어떤 배아들은 부분적 혹은 전적으로 해를 입게되며(Smorag et al., 1981; Schneider et al., 1983) 배아의 발생률은 대개 70~80% 범위로 보고되고 있다. 해빙과정에서 동해를 입는 경우가 많은데 이는 배아의 내부와 외부사이에서 일어나는 재수화(rehydration)에 따른 재결빙(recrystallization)에 의한 기계적 상해라고 알려졌다(Sherman, 1962; Mazur et al., 1973; Polge et al., 1978; Griffiths et al., 1979; Rall et al., 1984; Miyamoto, 1986).

아직도 냉동·해빙한 배아의 발생률을 높이기 위하여, 여러 가지 결빙억제제와 냉동액을 사용하고(Miyamoto et al., 1983), 결빙억제제의 농도를 조절하거나(Kojima et al., 1985), 냉각과 해빙의 속도를 달리하는 등(Polge et al., 1978; Rall et al., 1984) 배아에 미치는 해를 줄이기 위한 연구노력이 계속되고 있다.

따라서 본 실험은 냉동한 생쥐배아의 해빙속도와 해빙후 배아내에 포함되어 있는 외화한구가 그 후의 발생에 어떤 영향을 미치는가를 알아보고자 행하였다.

재료 및 방법

1. 배아의 획득

본 실험에는 한양대학교 생물학과에서 사육된 생후 6~8주된 생쥐(ICR strain)를 사용하였다. 배아의 획득을 위하여 암컷의 복강에 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG, Sigma) 5 iu를 주사하고 48시간 후 human chorionic gonadotropin(HCG, Sigma) 5 iu를 주사하여 과배란을 유도한 후 수컷과 교배시켰다. HCG 주사 후 54~56시간 또는 64~66시간 후 경추파괴로 도살하고 생식수관을 적출하여 약간 변경된 Dulbecco's phosphate buffered saline

(PBS)로 씻어내어 4-세포기 또는 8-세포기 배아를 수취하였다.

2. 냉동과 해빙

위와 같이 획득한 배아들은 10% fetal calf serum(FCS, Flow Lab.)을 포함한 PBS에 결빙억제제로서 dimethyl sulfoxide(DMSO, Merck)를 녹여 일련의 농도별 냉동액을 만들어 처리하고, 냉동 혹은 해빙하였다. 냉동과 해빙은 세포냉동기(cell freezer, Planar Products LTD, R204)를 사용하여 행하였다.

냉동방법은 Table 1에 요약한 것처럼 배아들을 10% FCS를 포함한 PBS에 10분간 정지한 후 4단계의 농도별 DMSO 용액(0.25, 0.5, 1.0, 1.5M in PBS)을 시간별로 처리하고, 1.5M DMSO 용액 0.4 ml을 넣은 유리관병(2ml ampoule, Wheaton Scientific)에 25~30개의 배아를 넣고 강한 불꽃으로 입구를 녹여 봉하였다. 냉각과정은 상온에서부터 -6°C까지는 비교적 빨리(2°C/min) 냉각하고, 미리 액화질소에 넣어 냉각시킨 핀셀으로 유리관병내의 냉동액 표면수준에 접촉하므로써 식빙(seeding)하여 -6°C에서 20분간 정지하였다가, -6°C에서부터 -80°C까지는 완만하게(0.3°C/min) 냉각시킨 후 액화질소통(-196°C, MVE, 43L)에 직접 넣었다. 이렇게 냉동한 배아들은 액화질소통 속에서 4~180일간 저장되었다.

Table 1. Procedure of freezing embryo

Process	Time or Cooling rate
Addition of cryoprotectant	
PBS+10% FCS	10 min
0.25M DMSO	10 min
0.5M DMSO	10 min
1.0M DMSO	10 min
1.5M DMSO	5 min
Packaging in glass ampoule (25~30 embryos/ampoule)	
Cooling to -6°C	2 °C/min
Seeding at -6°C	20 min
Cooling to -80°C	0.3 °C/min
Plunging in liquid nitrogen (-196°C)	

해빙방법은 Table 2에 요약한 것처럼 완만해빙과 급속해빙을 적용하였다. 완만해빙은 액화질소통으로부터 유리관병을 꺼내어 미리 -80°C로 맞추어 둔 세포냉동기에 넣고 8°C/min의 속도로 4°C까지 해빙한 후 유리관병을 다시 꺼내어 상온에 2분간 정지하였다. 급속해빙은 액화질소통으로부터 꺼낸

유리관병을 35°C 온수에 직접 넣어 35초 동안에 급속히 (450°C/min) 해빙하여 역시 상온에서 2분간 정지하였다. 결빙억제제를 제거하기 위하여 해빙된 배아들은 6 단계의 농도별 DMSO 용액 (1.5, 1.25, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25M in PBS) 을 시간별로 거친 후 10% FCS를 포함한 PBS로 세척하여 0.4% bovine serum albumin(BSA, Sigma)을 포함한 standard egg culture medium(SECM)(Biggers et al., 1971)에 옮겨 놓았다.

3. 퇴화할구의 제거 및 배아의 배양

위와 같이 해빙된 배아들은 해부현미경(Wild, M-5A) 아래에서 해를 입지않은 정상할구의 수에 따라 4-세포기와 8-세포기 각각 5군으로 나누었다(Table 3). 퇴화할구의 제거를 위하여 플라스틱 배양접

Table 2. Procedure of thawing embryo

Process	Time or Warming rate
*Slow thawing	
Warming from -80°C to +4°C	8 °C/min
**Quick thawing	
Dipping in 35°C water bath (for 35 seconds)	450 °C/min
Standing at room temp.	2 min
Removal of cryoprotectant	
1.5 M DMSO	10 min
1.25 M DMSO	10 min
1.0 M DMSO	10 min
0.75 M DMSO	10 min
0.5 M DMSO	10 min
0.25 M DMSO	10 min
PBS+10% FCS (washing twice)	3 min

Table 3. Grouping of the frozen and thawed mouse embryos according to the number of healthy blastomeres

Stage	Group	Embryonic phase
4-cell	4/4	Embryo with all healthy blastomeres
	3/4	Embryo with three healthy blastomeres
	2/4	Embryo with two healthy blastomeres
	1/4	Embryo with one healthy blastomere
	0/4	Embryo with all degenerated blastomeres
8-cell	8/8	Embryo with all healthy blastomeres
	6~7/8	Embryo with six or seven healthy blastomeres
	4~5/8	Embryo with four or five healthy blastomeres
	2~3/8	Embryo with two or three healthy blastomeres
	0~1/8	Embryo with one healthy or all degenerated blastomeres

시(petri dish, Falcon 1007)에 paraffin oil을 붓고 NaCl로 오스몰 농도를 조절한 Ca²⁺, Mg²⁺-free SECM방울 (30~50μl)을 만들어 퇴화할구를 내포하고 있는 배아 10~15개를 넣고 도립간섭현미경(inverted interference microscope, Nikon, TMD) 아래에서 현미조작기(micromanipulator, Narishige, Scientific Instrument Lab.)로 현미주사기술(Hiramoto, 1974; Kishimoto, 1986)을 응용하여 퇴화할구를 제거하였다(Plate I, Fig 2).

각 실험군의 배아들은 Brinster(1963)의 배양방법을 적용하여 공기중 5% CO₂와 충분한 습도, 그리고 37°C로 유지되는 배양기내에서 48시간 혹은 72시간 배양하여 포배기로 발생하는 울을 구하였다.

각 군간의 통계적 유의성 검정은 χ^2 -test로 P < 0.05일때 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 해빙속도의 영향

해빙속도에 따른 발생률은, 완만해빙 후 4-세포기에서 4/4군; 91.3%, 3/4군; 76.9%, 2/4군; 50.0%, 그리고 1/4군; 44.4%로 각각 나타나 평균 발생률은 72.7%이었으며, 8-세포기에서는 8/8군; 93.2%, 6~7/8군; 60.0%, 4~5/8군; 54.5%, 그리고 2~3/8군; 18.2%로 나타나 평균 발생률은 73.5%이었다.

한편 급속해빙 후 4-세포기에서는 4/4군; 94.4%, 3/4군; 87.5%, 2/4군; 73.7%, 그리고 1/4군; 52.9%로 나타나 평균 발생률이 78.9%이었으며, 8-세포기에서는 8/8군; 94.9%, 6~7/8군; 86.7%, 4~5/8군; 76.5%, 그리고 2~3/8군; 35.7%로 나타나 평균 발생률은 80.0%이었다(Table 4). 위 결과로

보아 급속해빙의 경우 완만해빙보다 4-세포기에서 평균 발생률은 6.2%의 증가를 나타내었으나, 유의하지 않았으며, 8-세포기에서는 6.5%의 증가를 나타내었고 이는 유의한($P < 0.05$) 차이를 보였다.

2. 퇴화할구의 영향

퇴화할구를 제거한 배아의 발생률은 4-세포기에서 3/4군; 93.3%, 2/4군; 80.0%, 그리고 1/4군; 60.0%로 나타났으며, 평균 발생률은 80.0%이었고 (Table 6), 8-세포기에서 6~7/8군; 95.2%, 4~5/8

군; 95.2%, 그리고 2~3/8군; 66.7%로 나타났으며, 평균 발생률이 91.8%로 나타났다 (Table 7). 퇴화할구를 제거하지 않은 대조군에 비해 4-세포기에서는 평균 발생률은 5.9%가 증가되었고, 8-세포기에서는 24.4%가 증가되었다. 냉동·해빙한 배아의 할구 과반수가 정상 일때 (3/4군, 6~7/8군, 4~5/8군) 퇴화한 할구를 제거하면 모든 할구가 정상인 배아 (4/4군, 8/8군) (Table 5)와 같이 높은 발생률 (93.3~95.2%)을 나타내었다.

일반적으로 난할속도는 배아내 정상할구수가 많

PLATE I

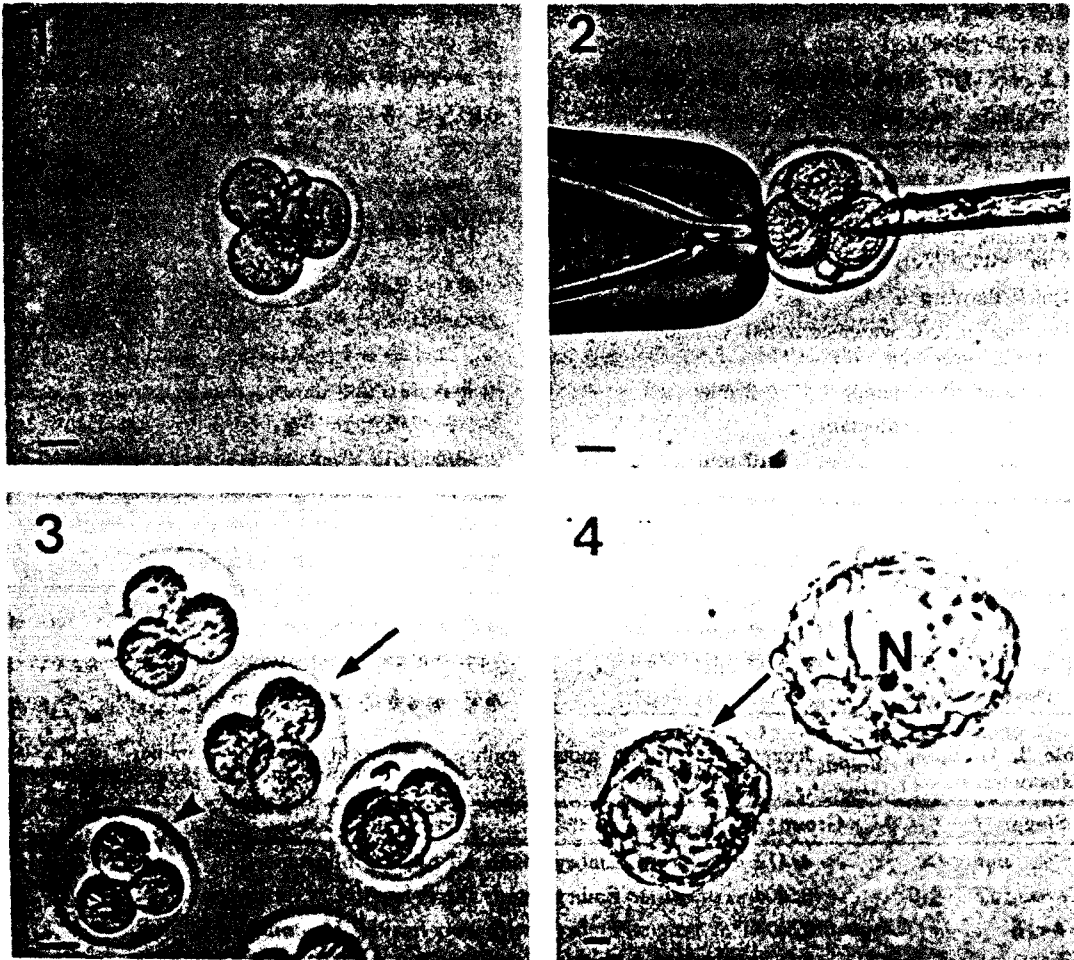


Fig. 1. One 4-cell embryo frozen and thawed including one degenerated blastomere(3/4 embryo).

Fig. 2. The same embryo as in Fig. 1 being eliminated the degenerated blastomere by means of micromanipulation technique.

Fig. 3. The same embryo (arrow) as in Fig. 2 and 3/8 embryo after elimination of the degenerated blastomers(s) (arrow head).

Fig. 4. The post hatching blastocyst (arrow) developed from the same embryo as in Fig. 3 after 72 hour cultivation.

Bar: 20 μ m, N: Blastocyst developed from normal embryo.

Table 4. Development upto blastocyst from the frozen 4-cell mouse embryos after thawing slowly and quickly.

Group	Slowly thawing			Quickly thawing		
	No. of embryos	No. of blastocyst(%)	No. of deg.	No. of embryos	No. of blastocyst(%)	No. of deg.
4/4	46	42(91.3)	4	72	68(94.4)	4
3/4	13	10(76.9)	3	16	14(87.5)	2
2/4	16	8(50.0)	8	19	15(73.7)	4
1/4	9	4(44.4)	4	17	9(52.9)	8
0/4	4	0(0.0)	4	9	0(0.0)	9
Total	88	64(72.7)	24	133	105(78.0) ^{a)}	28

"deg." means degenerated embryos.

^{a)} Slowly vs quickly; significant(P < 0.05)

Table 5. Development upto blastocyst from the frozen 8-cell mouse embryos after thawing slowly and quickly.

Group	Slowly thawing			Quickly thawing		
	No. of embryos	No. of blastocyst(%)	No. of deg.	No. of embryos	No. of blastocyst(%)	No. of deg.
8/8	103	96(93.2)	7	98	93(94.9)	5
6~7/8	25	15(60.0)	10	15	13(86.7)	2
4~5/8	22	12(54.5)	10	17	13(76.5)	4
2~3/8	11	2(18.2)	9	14	5(35.7)	9
0~1/8	9	0(0.0)	9	11	0(0.0)	11
Total	170	125(73.5)	45	155	124(80.0) ^{a)}	31

"deg." means degenerated embryos.

^{a)} Slowly vs quickly; significant(P < 0.01)

Table 6. Development upto blastocyst from the frozen and thawed 4-cell mouse embryos with or without elimination of the degenerated blastomere(s)

Group	No elimination			Elimination		
	No. of embryos	No. of blastocyst(%)	No. of deg.	No. of embryos	No. of blastocyst(%)	No. of deg.
3/4	16	14(87.5)	2	15	14(93.5)	1
2/4	19	15(73.7)	4	20	16(80.0)	4
1/4	17	9(52.9)	8	10	6(60.0)	4
Total	52	38(73.1)	14	45	36(80.0)	9

The developmental rate upto blastocyst from the frozen and thawed 4/4 embryo(with all healthy blastomeres) was 94.4%(68/72).

"deg." means degenerated embryos.

고 퇴화할구수가 적을 수록, 그리고 4-세포기 보다 8-세포기의 배아에서 빠르게 나타났다(Plate I, Fig. 4; Plate II, Fig. 1, 2).

논 의

냉동한 배아를 어떻게 해빙하는가에 따라 발생률에 큰 차이를 보이는데 해빙방법 자체도 사용하는

결빙억제제의 종류, 처리방법 그리고 냉동시의 냉각속도등에 의해서도 달라진다. 가장 높은 발생률을 얻는 냉동·해빙방법은 연구자들에 따라 달리 주장되고 있다. 즉, Whittingham(1974)과 Kasai 등(1980)은 급속냉각 후 급속해빙으로, Leibo 등(1974)과 Wood 등(1980)은 완만냉각 후 완만냉각으로, 그리고 Miyamoto 등(1983)과 Rall 등(1984)은 완만냉각 후 급속해빙으로 가장 높은 발생률을 얻었다고 보

Table 7. Development upto blastocyst from the frozen and thawed 8-cell mouse embryos with or without elimination of the degenerated blastomere(s).

Group	No elimination			Elimination		
	No. of embryos	No. of blastocyst(%)	No. of deg.	No. of embryos	No. of blastocyst(%)	No. of deg.
6~7/8	15	13(86.7)	2	21	20(95.2)	1
4~5/8	17	13(76.5)	4	21	20(95.2)	1
2~3/8	14	5(35.7)	9	9	6(66.7)	3
Total	46	31(67.4)	15	51	46(91.8)	5

The developmental rate upto blastocyst from the frozen and thawed 8/8 embryo(with all healthy blastomeres) was 94.9% (93/98).

"deg." means degenerated embryos.

PLATE II

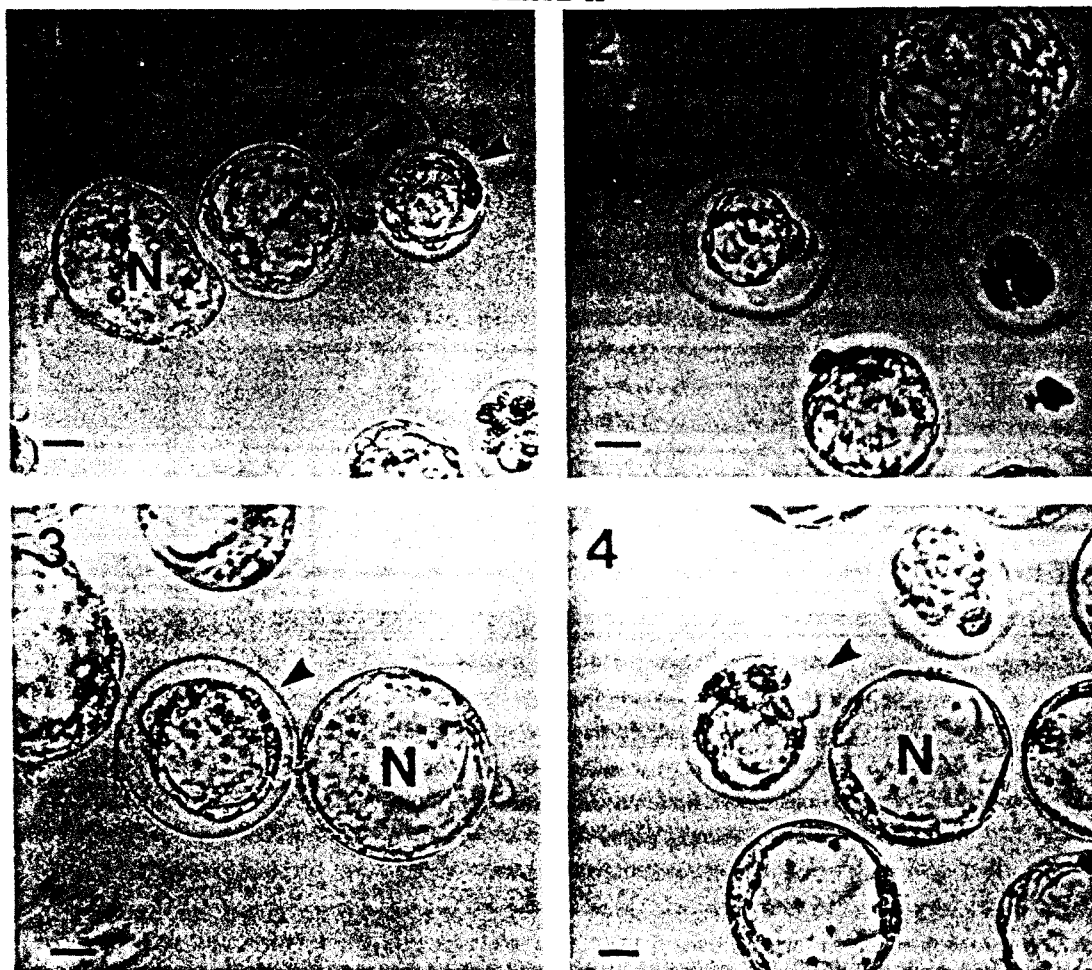


Fig. 1 and 2. Blastocysts developed from 3/4 embryo(arrow) and 2/4 embryo(arrow head) in Fig. 1 and 1/4 embryo(arrow head) in Fig. 2 after elimination of the degenerated blastomere(s). Note the differences in size and developmental phase of the embryos.

Fig. 3 and 4. Blastocysts(arrow head) developed from 2/4 embryo in Fig. 3 and 4/8 embryo in Fig. 4 elimination of the degenerated blastomeres. Note the differences in size and developmental phase of the embryos.

Bar: 20 μ m, N: Blastocyst developed from normal embryo.

고하였다. 그러므로 아직도 특별히 정해진 방법이 없이 발생률을 더 높이기 위하여 많은 연구가 계속 진행되고 있다.

본 실험에서 완만냉각 후 급속해빙이 완만해빙보다 평균 발생률을 약 6% 높힐 수 있었는데 이런 결과는, 완만해빙시에 흔히 일어나는 세포질내 재수화(rehydration)에 따른 재결빙(recrystallization) 현상(Rall, 1981)으로 기계적인 상해를 입히는 경우가 급속해빙시에는 잘 일어나지 않기 때문이라 추론된다. 본 실험에서 냉동·해빙한 배아들 중에 부분적으로 상해를 입은 배아는 전체의 39.1%였는데, 이는 다른 연구자들(Smorag et al., 1981; Schneider et al., 1983)의 결과(20~38%)와 거의 비슷하였다.

Tarkowski 등(1967)과 Rossant(1976)에 의하면 8-세포기의 할구는 4-세포기의 할구에 비하여 한 단계 더 분화하였으므로 체외에서 배양할 때 난할속도가 빠르고 포배기로의 발생률도 높으나 1개의 할구를 가진 1/8배아는 난할도 거의 하지 않았고 발생했다 하더라도 가포배(false blastocyst)로 되어 내세포괴(inner cell mass)를 관찰할 수 없다고 하였다. 본 실험에서 퇴화할구를 제거한 2/4군의 발생률이 80.0%인데 비해 4~5/8군의 발생률은 95.2%로 나타난 것을 보면 다른 연구자들의 결과와 일치하였다. 또한 본 실험에서 1/4군과 2~3/8군이 포배기로 발생될 때 정상배아에 비해 작기는 했으나, 형태적인 차이가 없었으며, 다만 2~3/8군이 발생속도가 빠른 것으로 나타나 이것도 다른 연구자들의 결과와 일치하였다(Plate I, Fig. 4; Plate II, Fig. 1~4).

본 실험에서 냉동·해빙한 배아들중 외견상 상해볼 전혀 입지 않은 배아들(4/4군, 2/3군)의 발생률은 약 95%로서 정상배아와 별 차이가 없었는데, 이는 정상배아와 냉동·해빙한 배아의 미세구조를 관찰하였을 때 별다른 구조적 차이를 볼 수 없었다(Whittingham et al., 1976)는 사실과 상응하는 결과이다. 그러나 냉동·해빙한 배아들이 외견상으로는 정상이고 또한 포배기까지의 발생률도 정상배아와 차이가 없다 하더라도 결빙억제제의 독성효과(Fahy, 1986) 등이 그 후의 발생에 어떤 영향을 미치는지에 관하여는 잘 알려져 있지 않다.

그러므로 이와 같이 냉동·해빙한 배아나, 이런 배아들을 배양하여 얻은 포배기 배아를 대모(foster mother)에게 이식하였을 때 착상 및 정상 세끼의 출생 그리고 기형의 출현등에 관하여 더 많은 연구가 계속되어야 할 것이다.

결 론

본 실험은 냉동저장한 4-세포기와 8-세포기 생쥐 배아의 발생에 미치는 해빙속도 및 퇴화할구의 영향을 알아보고자 행하였다.

과배란을 유도한 생쥐를 교배시켜서 얻은 배아들은 10% FCS를 포함한 PBS로 1.5M DMSO 용액을 만들어 처리한 후 완만냉동(0.3°C/min.) 하였고, 해빙속도는 완만(8°C/min.)과 급속(450°C/min.) 두 방법을 적용하였다. 해빙된 배아들은 포함하고 있는 정상할구 수에 따라 구분하였으며, 일부 배아의 퇴화할구는 현미조작기로 제거하였다. 그리고 배아들은 48시간 혹은 72시간 배양한 후 발생정도를 관찰하였다.

완만해빙 후 포배기까지의 발생률은 4-세포기가 72.8%, 8-세포기가 73.5%이었고, 급속해빙의 경우 각각 78.9%와 80.0%로서 급속해빙의 경우가 발생률을 유의하게 증가시켰다.

퇴화할구를 제거한 배아의 포배기까지의 발생률은 제거하지 않은 대조군에 비하여 4-세포기에서 5.9%, 8-세포기에서 24.4%의 증가율을 보였으며 퇴화할구를 많이 제거할수록 대조군에 비하여 발생률이 높았다.

위 결과로 보아 냉동저장한 생쥐배아의 해빙방법은 급속방법이 생존률을 높이는 데 좋으며, 배아내 퇴화할구는 발생에 저해요인으로 영향을 미친다는 결론을 얻었다.

REFERENCES

- Biggers, J.D., Whitten, W.K. and Whittingham, D. G.: *The culture of mouse embryos in vitro*. In: *Methods in Mammalian Embryology*. Daniel, Jr. J.C.(ed). Freeman and Co. San Francisco, pp. 86-116, 1971.
- Brinster, R.L.: *A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst*. *Exp. Cell Res.* 32:205-208, 1963.
- Fahy, L.E.: *The relevance of cryoprotectant "Toxicity" to Cryobiology*. *Cryobiology*, 23:1-13, 1986.
- Griffiths, J.B., Cox, C.S., Beadle, D.J., Hunt, C.J. and Reid, D.S.: *Changes in cell size during the cooling, warming and post-thawing periods of the freeze-thaw cycle*. *Cryobiology* 16: 141-151, 1979.
- Hiramoto, Y.: *A method of microinjection*. *Exp. Cell Res.* 87:403-406, 1974.
- Kasai, M., Niwa, K. and Iritani, A.: *Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly*. *J.*

- Reprod. Fert.* 59:51-56, 1980.
- Kasai, M., Niwa, K. and Iritani, A.: *Survival of rat embryos after freezing.* *J. Reprod. Fert.* 66:367-370, 1980.
- Kishimoto, T.: *Microinjection and cytoplasmic transfer in starfish oocytes.* *Methods Cell Biol.* 27:379-394, 1986.
- Kojima, T., Soma, T. and Ofuri, N.: *Effect of rapid addition and dilution of Dimethyl Sulfoxide on the viability of frozen-thawed rabbit morulae.* *Cryobiology* 22:409-416, 1985.
- Leibo, S.P., Mazur, P. and Jackowski, C.: *Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing.* *Exp. Cell Res.* 89:79-88, 1974.
- Massip, A., Van der Zwalm, P. and Leroy, F.: *Brief communication: Effect of stage of development on survival of mouse embryos frozen-thawed.* *Cryobiology* 21:574-577, 1984.
- Massip, A., Van der Zwalm, P., Puissnat, F., Camus, M. and Leroy, F.: *Effects of in vitro fertilization, culture, freezing and transfer on the ability of mouse embryos to implant and survive.* *J. Reprod. Fert.* 71:199-204, 1984.
- Maurer, R.R., Bank, H. and Staples, R.E.: *Pre- and postnatal development of mouse embryos after storage for different periods at cryogenic temperatures.* *Biol. Reprod.* 16:139-146, 1977.
- Maurer, R.R. and Haseman, J.K.: *Freezing morula stage rabbit embryos.* *Biol. Reprod.* 14:256-263, 1976.
- Mazur, P., Leibo, S.P. and Chu, E.H.: *A two factor hypothesis of Freezing injury.* *Exp. Cell Res.* 71:345-355, 1972.
- Miyamoto, H.: *Factors affecting the survival of mouse embryos during freezing and thawing.* *J. In Vitro Fert. Em. Tran.* 3:15-19, 1986.
- Miyamoto, H. and Ishibashi, T.: *Survival of mouse embryos frozen-thawed slowly or rapidly in the presence of various cryoprotectants.* *J. Exp. Zool.* 226:123-127, 1983.
- Polge, C. and Willadsen, S.M.: *Freezing eggs and embryos of farm animals.* *Cryobiology* 15:370-373, 1978.
- Rall, W.F. and Polge, C.: *Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol.* *J. Reprod. Fert.* 70:285-292, 1984.
- Rall, W.F., Reid, D.S. and Polge, C.: *Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physicochemical methods.* *Cryobiology* 21:106-121, 1984.
- Rossant, J.: *Postimplantation development of blastomere isolated from 4- and 8-cell mouse eggs.* *J. Embryol. Exp. Morph.* 36:282-290, 1976.
- Sherman, J.K.: *Survival of higher animal cells after the formation and dissolution of intracellular ice.* *Ana. Record.* 144:171-177, 1962.
- Schneider, U.: *Cryobiological principles of embryo freezing.* *J. In Vitro Fert. Em. Tran.* 3:3-9, 1986.
- Schneider, U. and Maurer, R.R.: *Factors affecting survival of frozen-thawed mouse embryos.* *Biol. Reprod.* 29:121-128, 1983.
- Smorag, Z., Katska, L. and Wierzbowski, S.: *Some factors affecting the success of embryo-freezing: Storage before freezing, superovulation rate, PBS concentration, cooling and thawing rates.* In: *Frozen storage of laboratory animals.* Zeilmaker, G.H. (ed). Gustav Fischer Stuttgart, New York, pp. 45-53, 1981.
- Tarkowski, A.K. and Wroblowska, J.: *Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage.* *J. Embryol. Exp. Morph.* 18:155-180, 1967.
- Trounson, A. O. and Mohr, L.: *Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo.* *Nature* 306:707-709, 1983.
- Trounson, A.O., Willadsen, S.M. and Rowson, L. E.A.: *The influence of in vitro and cooling on the survival and development of cow embryos.* *J. Reprod. Fert.* 47:367-370, 1976.
- Whittingham, D.G.: *Survival of mouse embryos after freezing and thawing.* *Nature* 233:125-126, 1971.
- Whittingham, D.G.: *Embryo banks in the future of developmental genetics.* *Genetics* 78:395-402, 1974.
- Whittingham, D.G.: *The viability of frozen-thawed mouse blastocysts.* *J. Reprod. Fert.* 37:159-162, 1974.
- Whittingham, D.G.: *Survival of rat embryos after freezing and thawing.* *J. Reprod. Fert.* 43:

- 578, 1975.
- Whittingham, D.G.: *Symposium on freezing of ova and embryos-synopsis pattern: Freezing embryos of laboratory species. Cryobiology* 15: 367-369, 1978.
- Whittingham, D.G. and Anderson, E.: *Ultrastructural studies of frozen-thawed 8-cell mouse embryos. J. Reprod. Fert.* 48:137-140, 1976.
- Whittingham, D.G., Leibo, S.P. and Mazur, P.: *Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . Science* 178:411-414, 1972.
- Willadsen, M.: *The developmental capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. J. Embryol. Exp. Morph.* 65:165-172, 1981.
- Willadsen, S.M., Polge, C., Rowson, L.E.A. and Moor, R.M.: *Deep freezing of sheep embryos. J. Reprod. Fert.* 46:151-154, 1976.
- Wilmut, I.: *The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. Life Science* 11:1071-1079, 1972.
- Wood, M.J. and Farrant, J.: *Brief communications: Preservation of mouse embryos by two-step freezing. Cryobiology.* 17:178-180, 1980.
-